

First Hit

L6: Entry 10 of 11

File: DWPI

Mar 24, 1989

DERWENT-ACC-NO: 1989-134282

DERWENT-WEEK: 198918

COPYRIGHT 2007 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Binding agent for human sperm immobilising antibody - used for treatment of infertility, comprises specific galactose, n-acetyl:glucosamine, glucose sequence

## PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

CODE

BIOMEMBRANE INST

BIOMN

TOA NENRYO KOGYO KK

TOFU

PRIORITY-DATA: 1987JP-0235954 (September 19, 1987)

Search Selected

Search ALL

Clear

## PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
<input type="checkbox"/> JP 01079120 A	March 24, 1989		007	
<input type="checkbox"/> JP 95064736 B2	July 12, 1995		006	A61K031/70

## APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	DESCRIPTOR
JP 01079120A	September 19, 1987	1987JP-0235954	
JP 95064736B2	September 19, 1987	1987JP-0235954	
JP 95064736B2		JP 1079120	Based on

INT-CL (IPC): A61K 31/70; A61K 31/715; A61K 31/73; C07H 15/12; C08B 37/00; G01N 33/53

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 01079120A

## BASIC-ABSTRACT:

Binding agent against human sperm immobilising antibody is composed of substance in which the structure of formula Gal betal-4GlcNAc betal- 3 Gal betal-4GlcNAc betal-3Gal betal-4Glc- (I) is contained. (where Gal = galactose, GlcNAc = N-acetylglucosamine, Glc = glucose, terminal Gal may not be sialated).

The terminal Gal is pref. 2,3-disialated or 2,6-disialated.

USE/ADVANTAGE - A binding agent which can bind with human sperm immobilising antibody specifically, is offered. By using the binding agent, human sperm immobilising antibody can be detected by enzyme immunoassay, RIA, etc. Also by fixing the binding agent with a carrier, and by flowing through the blood of infertility patients due to the human sperm immobilising antibody, the antibody can be removed from patients and the treatment of infertility becomes possible.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS: BIND AGENT HUMAN SPERM IMMOBILISE ANTIBODY TREAT INFERTILITY COMPRISE  
SPECIFIC GALACTOSE N ACETYL GLUCOSAMINE GLUCOSE SEQUENCE

ADDL-INDEXING-TERMS:  
DI TERMINAL GALACTOSE

DERWENT-CLASS: B04 S03

CPI-CODES: B04-B04C6; B04-B04D5; B04-C02; B11-C07A; B12-K04A;

EPI-CODES: S03-E14H4;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 \*02\*  
Fragmentation Code  
J0 J011 J3 J321 K0 L8 L814 L815 L818 L831  
L832 L834 M210 M211 M262 M281 M320 M423 M781 M903  
M904 P831 V735  
Markush Compounds  
198918-20101-U  
Registry Numbers  
1704X 1724X 1711X 1714X

Chemical Indexing M2 \*01\*  
Fragmentation Code  
F012 F013 F014 F015 F016 F019 F123 F199 H4 H405  
H424 H484 H5 H523 H8 J0 J012 J3 J322 J4  
J471 K0 L8 L814 L815 L819 L824 L831 L834 M1  
M126 M129 M141 M149 M210 M211 M262 M282 M311 M323  
M342 M373 M393 M413 M510 M523 M530 M540 M781 M903  
M904 P831  
Markush Compounds  
198918-20101-U  
Registry Numbers  
1704X 1724X 1711X 1714X

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1989-059523

Non-CPI Secondary Accession Numbers: N1989-102216

First Hit

L7: Entry 1 of 2

File: JPAB

Mar 24, 1989

PUB-NO: JP401079120A  
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 01079120 A  
TITLE: HUMAN SPERM IMMOBILIZING ANTIBODY BINDER

PUBN-DATE: March 24, 1989

## INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
ISOJIMA, SHINZO	
HAKOMORI, SENICHIRO	
TSUJI, YOSHIYUKI	

## ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
ISOJIMA SHINZO	
BIOMEMBRANE INST:THE	
TOA NENRYO KOGYO KK	

APPL-NO: JP62235954

APPL-DATE: September 19, 1987

INT-CL (IPC): A61K 31/73; G01N 33/53; C08B 37/00

## ABSTRACT:

PURPOSE: To prepare the subject binder, comprising a substance containing galactose, N-acetylglucosamine, glucose, etc., as structural units, capable of specifically binding to a human sperm immobilizing antibody, detecting and removing the antibody and enabling the treatment of infertility.

CONSTITUTION: This human sperm immobilizing antibody binder comprises a substance containing a structure represented by the formula (Gal is galactose; GlcNAc is N-acetylglucosamine; Glc is glucose; the terminal Gal may be sialated). Since the human sperm immobilizing antibody is capable of recognizing the structure represented by the formula, the binder may have any structure bound to the structure represented by the formula and may be bound to a carrier, e.g. another saccharide chain, a lipid, a protein, a peptide or an artificial or a natural polymer or glass. The binder can readily be chemically synthesized and the antibody can be detected by using the binder according to an enzyme immunoassay, a radioimmunoassay, etc. The antibody can be removed by passing blood through the carrier immobilizing the binder thereon.

COPYRIGHT: (C)1989, JPO

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-79120

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和64年(1989)3月24日

A 61 K 31/73

ACV

7431-4C

G 01 N 33/53

S-7906-2G

// C 08 B 37/00

Z-6779-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 ヒト精子不働化抗体結合剤

⑯ 特 願 昭62-235954

⑰ 出 願 昭62(1987)9月19日

⑱ 発 明 者 磯 島 晋 三 兵庫県西宮市武庫川町1番1号 兵庫医科大学内

⑲ 発 明 者 箱 守 仙 一 郎 アメリカ合衆国ワシントン州98119・シアトル・エリオット・アベニュー・ウエスト・201・スート・305 ザ・バイオメンブレン・インスティテュート内

⑳ 発 明 者 辻 芳 之 兵庫県西宮市武庫川町1番1号 兵庫医科大学内

㉑ 出 願 人 磯 島 晋 三 兵庫県西宮市武庫川町1番1号 兵庫医科大学内

㉒ 出 願 人 ザ・バイオメンブレイン・インスティテュート アメリカ合衆国ワシントン州98119・シアトル・エリオット・アベニュー・ウエスト・201・スート・305

㉓ 出 願 人 東亜燃料工業株式会社 東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号

㉔ 代 理 人 弁理士 谷川 英次郎

明 細 書

【従来の技術】

1. 発明の名称

ヒト精子不働化抗体結合剤

2. 特許請求の範囲

(1) Gal  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  3 Gal  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  3 Gal  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 Glc- (ただし、Gal はガラクトース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、Glc はグルコースを示し、末端のGal はシアル化されていてもよい) の構造を含む物質から成るヒト精子不働化抗体結合剤。

(2) 末端のGal が2,3-ジシアル化されている特許請求の範囲第1項記載の結合剤。

(3) 末端のGal が2,6-ジシアル化されている特許請求の範囲第1項記載の結合剤。

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

この発明は、ヒト精子を不働化する抗体と特異的に結合する結合剤に関する。この発明の結合剤は、ヒト精子不働化抗体の検出及び除去に用いることができる。

従来より、原因不明不妊婦人の十数%に、精子不働化抗体の存在が兵庫医科大学産婦人科のグループにより報告されている(文献: イソジマ・エス、リ・ティ・エス及びアシタカ・ワイ、"Am. J. Obst. Gynecol.", 101:677-683 (1968) 及びイソジマ・エス、ツチャ・ケイ、コヤマ・ケイ、タナカ・シー、ナカ・オー及びアダチ・エイチ、"Am. J. Obst. Gynec.", 112:199-207, (1972))。また、同グループによりヒト精子不働化単クローン抗体が開発された(特願昭61-153581)。もし、このようなヒト精子不働化抗体に特異的に結合する結合剤が存在すれば、それを用いて該抗体を検出したり、あるいは該抗体を人体から除去して不妊症患者の治療を行なうことができる。しかしながら、従来、このようなヒト精子不働化抗体と特異的に結合する結合剤は知られていない。

【発明が解決しようとする問題点】

従って、この発明の目的は、ヒト精子不働化抗体と特異的に結合する結合剤を提供し、それに

よって該抗体の検出及び除去を可能にすることである。

【問題点を解決するための手段】

ヒト精子に強い不働化作用及び凝集作用を持つヒト型モノクローナル抗体H6-3C4（兵庫医科大学磯島らによって確立されたもの）の対応抗原が精液及び射精精子表面に付着せる糖タンパク質であることが明らかになってきた為、フレッド・ハチンソン・インスティテュートのハコモリらによって発見されているラクトノルヘキサオシルセラミド（Ⅰ抗原）、ラクトイソオクタオシルセラミド（Ⅱ抗原）及びこれらの末端にシアル酸が結合した糖鎖並びにこれらに関連ある糖鎖に反応するか否かを調べた結果、ある条件下で反応することが判明したので、ハコモリらによって作製された数種の糖鎖に対するモノクローナル抗体及び抗血清と、モノクローナル抗体H63C4の反応性の性質を比較検討した。

すなわち、本願発明者らは、鋭意研究の結果、特定の構造を有する糖鎖がヒト精子不働化抗

体と特異的に結合することを見出しこの発明を完成した。

すなわち、この発明は、Gal  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  3 Gal  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 Glc-（ただし、Gal はガラクトース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンGlc はグルコースを示し、末端のGal はシアル化されていてもよい）の構造を含む物質から成るヒト精子不働化抗体結合結合剤を提供する。なお、この発明は、上記抗ヒト精子不働化ヒト型モノクローナル抗体が開発されたために可能となったものである。

【発明の効果】

この発明により、ヒト精子不働化抗体と特異的に結合する結合剤が提供された。この結合剤を用いて、周知の酵素免疫分析、放射免疫分析又は競合的阻害分析法等によりヒト精子不働化抗体を検出することができる。また、この発明の結合剤を適当な担体に固定し、そこにヒト精子不働化抗体が原因の不妊症患者の血液を流通させることによって患者の体内から精子不働化抗体を除去する

ことができ、それによって不妊症の治療が可能になる。

【発明の具体的説明】

上述のように、この発明の結合剤はGal  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  3 Gal  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  3 Gal  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 Glc-の構造を含む。末端のGal はシアル化されていてもされていなくてもよい。シアル化されている場合、結合するシアル酸の種類や個数に限定はない。

後述の実施例で明らかになるように、ヒト精子不働化抗体は上記構造を認識するので、この発明の結合剤は、上記構造を含むものであればよく、上記構造にいかなる構造、例えば他の糖鎖、脂質、タンパク質、ペプチド等が結合したものであってもよく、また、人工又は天然のポリマーやガラス等の担体に結合されていてもよい。さらに、上記構造中の糖に、ヒト精子不働化抗体との結合に影響を与えない置換基が導入されていてもよく、このような置換体も上記構造式に包含されるものとする。

この発明の結合剤は、当業者によって容易に化学合成することができ、例えば、ニーマン・エイチ、ワタナベ・ケイ、ハコモリ・エス、チャイルズ・アール・エイ及びフェイジ・ティール、"Biochem. Biophys. Res. Commun. 81:1286, 1978)に記載されている。

次に、この発明の結合剤の使用方法を説明する。上述のように、この発明の結合剤はヒト精子不働化抗体を検出するための検出試薬として、また、該抗体を除去するための結合剤として用いることができる。抗体に対する抗原又はハプテンを利用してその抗体を検出、定量する方法は免疫分析の分野において周知であり、例えば周知の酵素免疫分析や放射免疫分析により行なうことができる。例えば、この発明の結合剤を適当な担体に固定化し、これと検体とを接触させた後、適当な酵素や放射性同位体で標識した抗ヒト免疫グロブリンを反応させてその標識を検出することにより、ヒト精子不働化抗体を検出、定量することができる。また、この発明の結合剤を担体に固定化し、

この固定化結合剤上に患者の血液を流通させて血液中の精子不働化抗体を固定化結合剤に結合させることによって患者の体内から精子不働化抗体を除去することができる。なお、この発明の結合剤の担体への結合は当業者が容易に行なうことができる。

#### 【発明の実施例】

#### 1. ヒト精子不働化ヒト型単一クローン抗体の調製 リンパ球の採取

強い精子不働化及び精子凝集抗体を有する、15年以上不妊の39歳の女性から末梢血リンパ球を採取した。通常の医学的検査によりこの女性を調べたところ、血清中に高力価の精子不働化及び精子凝集抗体が存在することを除き、他に合理的な不妊の原因は発見されなかった。彼女の血清中の抗体力価は、精子不働化値が  $SI_{50}$  として45.0 (磯島と香山, Quantitative estimation of sperm immobilizing antibody in the sera of woman with sterility of unknown etiology: the 50% sperm immobilization unit ( $SI_{50}$ )).

37℃で5日間培養した。培養後、個々のウェルから採取された刺激されたリンパ球をプールし、2回洗い、10mlのRPMI 1640 培地中に懸濁した。この刺激操作後、トリパンブルー染色法により調べたところ、58%のリンパ球が生存していた。

#### 細胞融合

栗田らの方法 (Sperm-immobilizing monoclonal antibody to human seminal plasma antigens. Clin. Exp. Immunol. 42:458-462 (1980)) に従い、分子量1000のポリエチレングリコールの存在下で、先に得られた刺激された生きているリンパ球  $5.3 \times 10^6$  個と、同数のマウスミエローマ細胞 (P3-NS-1/1.Ag. 4: NS-1) とを融合した。100  $\mu$ l の融合細胞を96個のウェルのそれぞれに入れ、5%  $CO_2$  インキュベーター中で37℃で培養した。96個のウェルのうち27個にはウェル当たり  $1 \times 10^5$  個のリンパ球のみを収容し、他の69個のウェルにはウェル当たり  $4 \times 10^5$  個のリンパ球と、支持細胞層として  $6 \times 10^5$  個のマウス胸腺細胞を収容した。培養24時間後に培地をHAT選

In Recent Advances in Human Reproduction (Campos da Paz, A., Drilli, V.A., Hyashi, H., Redrigues, W. and Schally, A.V. eds), pp10-15, Excerpta Medica, Amsterdam; 1976), 精子凝集値が1:32希釈 (Friberg, J. (1974). A simple and sensitive micromethod for demonstration of sperm-agglutinating activity in serum from infertile men and women. Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl. 35:21-29) であった。末梢血リンパ球は、フィコール-コンレー密度勾配遠心により単離した。

#### リンパ球の刺激

PWMレクチン (終濃度1:100、米国ギブコ社製) と10% ウシ胎児血清 (FCS) とを含む15mlのRPMI 1640 培地に、採取したリンパ球  $1.0 \times 10^7$  個と、健康人からの洗浄した精子  $5 \times 10^6$  個とを懸濁した。この混合物をコーニングプレート (米国コーニング社製、コーニング-25820) の15のウェルに分注し、5%  $CO_2$  インキュベーター中で

択培地に変え、培養12、19、及び23日後に個々のウェルの上清を後述するサンドイッチ酵素免疫分析法により試験してヒト免疫グロブリンを産生しているかどうか調べた。培養23日後では、支持細胞層を用いない27ウェルのうち14ウェルで、支持細胞層を用いた69ウェルのうち44ウェルで細胞の増殖が認められた。

#### 酵素免疫分析によるヒト免疫グロブリンの検出

サンドイッチ酵素免疫分析に用いる全ての結合剤は米国キャベルラボラトリーズ製のものであった。ポリビニルプレート (米国、ファルコン-3912) の96個のウェルを、0.05M 重炭酸緩衝液 (pH9.6) 中ウサギ抗ヒト免疫グロブリン (IgG + IgA + IgM) 抗血清 IgG 分画 (タンパク濃度0.8  $\mu$ g/100  $\mu$ l/ウェル) でコーティングし、4℃で一夜培養した。プレートの未結合領域は1%ウシ血清アルブミン (BSA) と5%正常ウマ血清とを含む0.15M リン酸緩衝液 (pH7.4) (ブロッキング溶液) をウェルに入れて室温で1時間インキュベートすることによってブロックした。0.05% の

Tween20 を含むリン酸緩衝液でウェルを洗った後、50 $\mu$ l の培養上清を加え、室温で2時間培養した。ヤギ抗ヒト免疫グロブリン血清から作られたF(ab')<sub>2</sub> をパーオキシダーゼで標識したものをブロッキング溶液で1:4000に希釈したものを50 $\mu$ l をウェルに加えた。室温で1時間インキュベートした後プレートを洗い、0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む0.1M クエン酸緩衝液(pH5.0) 中オルソフェニレンジアミン(和光純薬工業社製)を終濃度0.02%となるように加えた。反応は50 $\mu$ l の10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えることによって停止し、マイクロプレート光度計(MTP 12, コロナ電機社製)で測定した。その結果、増殖が認められた上記58ウェルのうち、22ウェルからヒト免疫グロブリンが検出された。

#### 酵素免疫分析による抗精子抗体の検出

96ウェルのポリビニルプレート(ファルコン-3912)を洗浄したヒト精子でコーティングした。コーティングは、50 $\mu$ l の精子懸濁液(6 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml)を個々のウェルに加え、室温で空気乾燥することによって行なった。プレートは使用時まで

ブリドーマを、15% FCS を含むRPMI 1640 培地中で6 $\times$ 10<sup>5</sup>/ウェルのマウス胸腺細胞と共に37℃で5% CO<sub>2</sub>インキュベート中で培養した。培養は、96ウェルコーニングプラスチックプレートの第1列の8つのウェルに約1 $\times$ 10<sup>5</sup> ハイブリドーマ/ウェルの濃度に上記培養液を入れ、1列ごとに1:2に段階希釈して行なった。従って最後の列は1:2<sup>7</sup>に希釈された。培養17日後、96ウェルのうち4つのウェルで細胞の増殖が認められ、そのうちの2つで強い精子不動化抗体が検出された。そのうちの1つのウェルからハイブリドーマを採取し、先に行なったのと全く同様にして第2回目のクローニングを行なった。その結果、96ウェルのうち46のウェルで細胞の増殖が認められ、そのうちの42のウェルで精子不動化抗体の産生が認められた。42のウェルのうち、精子不動化抗体価の最も高かったウェルからハイブリドーマを採取し、第3回目のクローニングを同様にして行なった。その結果、96のウェルのうち56のウェルで細胞の増殖が認められ、56の

で4℃で貯蔵した。1% BSAと2%正常ウマ血清とを含むリン酸緩衝液を個々のウェルに加え、室温で1時間保持してウェルのタンパク結合領域をブロックした。リン酸緩衝液で洗った後、50 $\mu$ l の培養上清を精子でコートされたウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。その後、先に述べた免疫グロブリンの検出と全く同様にして抗ヒト精子抗体を検出した。その結果、ヒト免疫グロブリンが検出された22ウェルのうち1つのウェルから抗ヒト精子抗体が検出された。この抗体をH6-304抗体と命名した。

また、同じウェルの上清中には磯島等の微量精子不動化試験(イソジマ・エス及びコウヤマ・ケイ, "Microtechnique of sperm immobilization test" in Immunology of Reproduction (Bratanov Kら編), pp. 215-219, Bulgarian Academy of Science, Sofia, 1979)によって精子不動化抗体活性も認められた。

#### 抗ヒト精子抗体産生細胞のクローニング

抗ヒト精子抗体が検出されたウェル中のハイ

ウェルの全てで強い精子不動化抗体が検出された。これらのウェルのうちの1つを取り、以下の実験に用いた。なお、このハイブリドーマは兵庫医科大学において2年間安定に培養されている。

このハイブリドーマを24ウェルのプラスチックプレート(コーニング-25820)に移し37℃で5% CO<sub>2</sub>インキュベート中で培養した。細胞が増殖した後、培養物を組織培養フラスコ(コーニング-25100と25110)に広げて培養した。この培養物からヒト精子不動化ヒト単クローン抗体を採取した。

#### 抗体吸収試験

このヒト精子不動化ヒト単クローン抗体の特異性を調べるために抗体吸収試験を行なった。抗体吸収試験は、種々の組織抽出液(ホモジネート上清)、体液、種々の動物の精子を免疫吸収体として用いてこのハイブリドーマの培養上清を吸収し、残遊する抗体活性を精子不動化試験により求めることによって行なった。正常ヒト血清の

10% 生理食塩水溶液で適当に希釈した培養上清 10  $\mu$ l を、100  $\mu$ l の段階希釈した免疫吸収体と混合し、この混合物を 4℃ で一夜インキュベートした。試験の前に予め培養上清の抗体活性を SI<sub>50</sub> 値で約 10 単位に調節した。インキュベート後、上清を遠心分離し (9500g, 30分)、精子不動化値を調べた。ヒト精液 (HAS)、ヒト母乳 (HM) 及び正常ヒト血清 (NHS) は硫酸アンモニウムで沈殿させ、蒸留水に対して十分に透析し、凍結乾燥した。精液内に貯蔵された体液についても同様に透析し、凍結乾燥した。免疫吸収試験に際して、これらは生理食塩水に溶解した。動物の精子は 3 回生理食塩水で洗った後免疫吸収試験に用いた。結果を第 1 表に示す。

第 1 表

## H6-3C4 単クローン抗体の特性

免疫グロブリンクラス	lgM( $\lambda$ )
生物学活性	
精子不動化	+ (5000 SI <sub>50</sub> )
精子凝集	+ (1:1500 希釈)

る。

また、上記単クローン抗体の種特異性 (精子に対する反応性) は以下の通りである。

ブタ	±
ウシ	-
ヤギ	-
ウサギ	-
ハムスター	-
ラット	-

H6-3C4 抗体の対応抗原が精子付着抗原で、精漿中にも存在することが明らかとなったので、精漿を用いて H6-3C4 対応抗原の性状分析を行った。抗原活性は精漿の 100% 飽和硫酸沈殿分画に存在し、セファクリル S-300 (商品名) によるゲルろ過では分子量 670 kd 以上の高分子分画に溶出されたが、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では分子量約 20kd 付近に泳動された。

セファクリル S-300 ゲルろ過分画により部分精製した H6-3C4 対応精漿抗原分画を用いてその抗原エпитーブの性状を分析した。抗原活性は熱処

ヒト組織に対する特異性

射精精子	+
精液	+
母乳タンパク質	-
血清タンパク質	-
睾丸	-
精巣上体	定かでない
精囊貯蔵液	+
前立腺	±
肝臓	-
脾臓	-
脳	-
B 型赤血球	-
白血球	-
無精子症患者精漿	+
精囊腺分泌液	+

これらの結果から、上記ヒト精子不動化ヒト単クローン抗体の対応抗原は、男性副性器より分泌され精子に付着するいわゆる精子被覆抗原 (sperm coating antigen) であると判定され

理 (100℃, 30分) に抵抗を示したが、過ヨウ素酸処理により抗原性が減少した。また、タンパク質分解酵素処理に対してはプロナーゼ、パバイン処理でわずかに抗原性が減少したもののトリプシン、 $\alpha$ -キモトリプシン、ペプシン処理に対しては抵抗性を示した。以上の結果を第 2 表にまとめて示す。

この結果、H6-3C4 対応抗原の抗原エピトープ形成に糖鎖の関与を強く示すものである。

第 2 表

## H6-3C4 抗体の対応抗原の性質

分子量: セファクリル S-300 (商品名) ゲルろ過

670 kd

SDS-PAGE: 約 20 kd

各種抗原処理に対する抗原の感受性

熱処理	-
過ヨウ素酸	+
蛋白分解酵素	
プロナーゼ	±
パバイン	±



トリブシン -  
 $\alpha$ -キモトリブシン -  
 ベブシン -

# 11. ヒト精子不動化抗体と糖鎖との結合

## 糖脂質の合成

下記第3表に示す種々の糖脂質を合成した。  
 ラクトネオテトラオシルセラミド及びそのシアル  
 化誘導体は、ワタナベ・ケイ、ボウエル・エム・  
 イー及びハコモリ・エス、"J. Biol. Chem.",  
 254:8223, 1979に記載された方法により合成し  
 た。ラクトノルヘキサオシルセラミド及びそのシ  
 アリル2→3誘導体は、ニーマン・エイチ、ワタ  
 ナベ・ケイ、ハコモリ・エス、チャイルズ・アー  
 ル・エイ及びフェイジ・ティ、"Biochem.  
 Biophys. Res. Commun. 81:1286, 1978 に記載さ  
 れた方法により合成した。シアリル2→6ラクト  
 ノルヘキサオシルセラミドは上記ワタナベらの文  
 献に記載された方法により合成した。ラクトイソ  
 オクタオシルセラミド及びそのシアル化誘導体は  
 ワタナベ・ケイ、ハコモリ・エス、チャイルズ・

アール・エイ及びフェイジ・ティ、"J. Biol.  
 Chem" 254:3221, 1979及びオカダ・ワイ、カンナ  
 ギ・アール、レベッリー・エス・ビー及びハコモ  
 リ・エス、"J. Immunol." 133:835, 1984 に記載  
 された方法により、ヒト及びウシ赤血球から調製  
 した。

第3表

名称	構造	略号
ラクトネオテトラオシルセラミド	Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4Glc → (Cer)	PG
シアリル2→3 ラクトネオテトラオシルセラミド	Neu Ac $\alpha$ 2→3Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4Glc → (Cer)	2, 3 SPG
シアリル2→6 ラクトネオテトラオシルセラミド	Neu Ac $\alpha$ 2→6Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4Glc → (Cer)	2, 6 SPG
ラクトノルヘキサオシルセラミド	Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4Glc → (Cer)	i
シアリル2→3 ラクトノルヘキサオシルセラミド	Neu Ac $\alpha$ 2→3Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4Glc → (Cer)	2, 3 S-i
シアリル2→6 ラクトノルヘキサオシルセラミド	Neu Ac $\alpha$ 2→6Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4Glc → (Cer)	2, 6 S-i
ラクトイソオクタオシルセラミド	Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1 3 Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4Glc → (Cer) 6	I
ジシアリルラクトイソ オクタノシルセラミド	Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1 3 Neu Ac $\alpha$ 2→3Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1 3 Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4Glc → (Cer) 6	I
フコシル $\alpha$ 1→2 ラクトノルヘキサオシルセラミド	Neu Ac $\alpha$ 2→3Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1 3 Fuc $\alpha$ 1→2Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4Glc → (Cer)	IIa
フコシル $\alpha$ 1→3 ラクトノルヘキサオシルセラミド	Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→3Gal $\beta$ 1→4Glc → (Cer) 3 Fuc $\alpha$ 1	Le <sup>a</sup>

## 糖脂質とヒト精子不活化抗体との結合試験

上記ヒト精子不活化抗体と上記各種糖脂質との結合性を試験した。結果を下記第4表に示す。

第4表

糖脂質略号	結合性
PG	-
2,3SPG	-
2,6SPG	-
i	+
2,3S-i	+
2,6S-i	+
I	-
2,3S-i	-
H <sub>2</sub>	-
Le <sup>x</sup>	-

第4表より、上記ヒト精子不活化抗体は、糖

脂質 i (Gal  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  3 Gal  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  3 Gal  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 Glc-セラミド) 及びその末端の Gal がシアル化されたものに特異的に結合することがわかる。また、上記糖脂質 i にフコースが結合して糖鎖骨格がねじれたもの (糖脂質 H<sub>2</sub> 及び Le<sup>x</sup>) とは結合しないことから、ヒト精子不活化抗体は、上記糖鎖構造を特異的に認識していることがわかる。さらに、糖脂質 i と結合することが知られている Dench 血清は末端の Gal がシアル化されたものとは結合しないことから、上記ヒト精子不活化抗体は、末端のシアル酸の結合の有無に影響されない、i 分子上の深部のエпитープ、すなわち、Gal  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  3 Gal  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  3 Gal  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 Glc の構造を横から見渡す方向より認識しており、これがエпитープの最小構成単位であることがわかる。

特許出願人代理人 弁理士 谷川 英次郎

